

## FREEZE-DRIED VACCINE FOR HEPATITIS A

Patent Number: JP1279843  
Publication date: 1989-11-10  
Inventor(s): MORITSUGU YASUO; others: 04  
Applicant(s): YASUO MORITSUGU; others: 03  
Requested Patent: JP1279843  
Application Number: JP19880106749 19880428  
Priority Number(s):  
IPC Classification: A61K39/29 ; A61K9/14 ; A61K47/00  
EC Classification:  
Equivalents: JP2042887C, JP7061955B

---

### Abstract

---

**PURPOSE:** To obtain the subject vaccine resistant to the lowering of titer, having excellent storage stability and quickly soluble in use, by purifying a virus obtained by tissue culture, inactivating the product and freeze-drying in the presence of a stabilizing agent.

**CONSTITUTION:** A large amount of hepatitis virus A (HAV) is produced by the tissue culture using (A) GL-37 cell capable of highly producing HAV and established from the cultured kidney cell of African green monkey by cloning using a colony culture method and (B) an HAV strain KRM 003 strain separated from the feces of hepatitis A patient and having excellent sensitivity to the above cell. The obtained HAV is highly purified, inactivated, added with a stabilizing agent and freeze-dried. The stabilizing agent is 0.1-2.0% (W/V) of an amino acid such as glycine, alanine or lysine or their salt, 0.1-15% of sugars such as glucose, lactose or mannitol and 0.01-0.1% of a gelatinizing agent such as gelatin or human albumin.

---

Data supplied from the [esp@cenet](mailto:esp@cenet) database - I2

1-279842 (8)

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

平1-279843

⑫ Int. Cl. \*

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)11月10日

A 61 K 39/29  
9/14  
47/00

3 1 6

8829-4C  
D-7417-4C  
J-7417-4C

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全5頁)

⑭ 発明の名称 凍結乾燥A型肝炎ワクチン

⑮ 特 願 昭63-106749

⑯ 出 願 昭63(1988)4月23日

特許法第30条第1項適用 昭和62年11月5日、「第35回日本ウイルス学会総会」において文書をもって発表

⑰ 発 明 者	森 次	保 雄	東京都八王子市台町1-14-23
⑰ 発 明 者	戸 塚	政 子	東京都昭島市三川町5-16-2-107
⑱ 出 願 人	森 次	保 雄	東京都八王子市台町1-14-23
⑱ 出 願 人	デンカ生研株式会社		東京都中央区日本橋兜町12-1 太洋ビル
⑱ 出 願 人	千 葉 県		千葉県千葉市市場町1丁目1番地
⑱ 出 願 人	財団法人化学及血清疫学研究所		熊本県熊本市清水町大塩663番地
⑲ 代 理 人	弁理士 筒 井 知		

最終頁に続く

*lyophilized hepatitis A vaccine*

# 明 細 書

## 1. 発明の名称

凍結乾燥A型肝炎ワクチン

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 凍結乾燥により得られたウイルス液を精製し、不活化した製品に安定化剤を加え、凍結乾燥して得られるA型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤。
- (2) 安定化剤としてアミノ酸またはその塩、及び糖類を加える特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
- (3) 安定化剤としてアミノ酸またはその塩、糖類及び保湿剤を加える特許請求の範囲第(1)項記載の製剤。
- (4) アミノ酸またはその塩が、グリシン、アラニン、グルタミン酸ナトリウム、アルギニン及びリジンから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲第(2)項記載の製剤。
- (5) 糖類がグルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース、ラクトース、マルトース、アッカロース、マンニット、ソルビット及びキシリットから選ばれる少なくとも1種である特許請求の範囲

## 第(2)項記載の製剤。

(6) 保湿剤がゼラチン、ヒトアルブミンまたはデキストランである特許請求の範囲第(1)項記載の製剤

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は、A型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤に関する。さらに詳しくは、凍結乾燥法により得られたウイルスを精製し、不活化後、安定化剤の存在下で凍結乾燥を行うことを特徴とするA型肝炎ワクチンの凍結乾燥製剤を提供するものである。

## 発明の背景

A型肝炎は、A型肝炎ウイルス（以下、HAVと略称する）によって起こり、疫学的にも、臨床的にも非常に重要な感染症であり、いまだ有効な治療法が見い出されていない。そのため、このようなA型肝炎に対してもっとも予防法が検討されており、現在はグロブリン製剤を2-3か月おきに投与することが行われている。しかし、グロブリン製剤中の抗HAV抗体力価の低下の問題や前回投与の必要性のため、ワクチンの開発が望まれてきたが、まだ実用化されるまでには至っていない。

ところで、A型肝炎ワクチンは、HAVの常在地域への感染の防止する効果を有していると共に、世界中いたるところで起こる散发性A型肝炎の二次感染を防止する効果を有している。これらのことから、A型肝炎ワクチン製剤は日本国内はもとより、広く世界各地において使用可能であることが必要である。すなわち、安定性がすぐれ、長期保存に充分に耐え得る製剤の提供は必須の条件である。

本発明者は、A型肝炎患者の尿便より抽出されたHAV KRN003株とHAV感受性細胞を用いた連続培養によるウイルスの増殖としてワクチンの開発を試みてきた。(第33回日本ウイルス学会抄録 257頁、(1985))

通常、滅状ワクチンには防腐剤が加えられており、一般的には広い抗菌スペクトルを有するナメロサールが加えられている。ところが、本発明者はワクチン開発中に、精製HAV抗原にナメロサールを加えるとHAV抗原活性が低下する現象を見出した。(第35回日本ウイルス学会抄録 234頁、

(1987)) さらに、あらかじめ精製HAV抗原にエチレンジアミン四酢酸(以下、EDTAと略称する)を加えておくことと抗原活性の低下が抑えられることより、前述の現象はナメロサール中の2価の水素イオンに起因するものと考えられた。しかしながら、EDTA添加はある程度効果は認められるものの完全ではなく、また、EDTAの添加は注射時に痛みを伴うことより、該EDTAを含まない滅状乾燥製剤が好ましいと考えられた。しかし、通常の滅状製剤にみられるような条件下でそのまま連続培養を行うと、乾燥の過程において力価が低下する欠点が生じることが判明した。

#### 発明の目的

本発明者は、上記のような問題を解決すべく抗原精製を重めた結果、抗原力価の低下や性状の悪化を伴わずに連続培養することを可能ならしめ、かつ乾燥品の保存安定性も滅状製剤に比して格段に良好となる連続培養の条件と、安定化のための製剤の配合組成とを見出すことにより本発明を完成した。

#### 発明の概要および効果

本発明に用いるA型肝炎ウイルスは、組織培養より得られたウイルスが使用される。HAVは長い間培養細胞で増殖出来なかったが、1979年に王よりやくProvostとHilleman(Provost, P. J. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 151, 213, (1979))による初の成功が報告された。彼らはムネアカハラタマリンを使ってHAVの感染を行い、肝臓から抽出したウイルスをムネアカハラタマリンの肝臓の培養切片に接種し、初めてHAVが増殖するのを確かめるとともにアカゲザルの胎児の腎臓培養細胞(FRhk6)でも増殖することを見出した。その後世界各地でいろいろな培養細胞を用いて試験された結果、原発性肝癌由来の培養細胞(Alexander hepatoma cell)(Frosner, G. G. et al., Infection 7, 303, (1979)), Vero細胞(Locarnini, S. A. et al., J. Virol., 17, 216, (1981)), アフリカモドリザル腎細胞培養細胞(Daener, R. J. et al., Infect. Immun., 11, 388, (1981))などでも増殖することが確かめられた。本発明者は、アフリカモドリザル

腎臓培養細胞よりコロニー培養法によるクローニングによって抽出されたHAV感受性細胞株GL-37細胞と、同じくA型肝炎患者の尿便より分離したGL-37細胞に感受性のすぐれているHAV株KRN003株を用いた組織培養により、大量にHAVを得ることができた。

上記の方法により得られたHAVは、ポリエチレングリコール分画、超遠心、有機溶媒処理、酢酸処理、ゲルろ過等の生物学的活性物質の分離精製に用いられる方法の組合せにより、高濃度に精製して精製品とし、ホルマリンにて不活化した後、本発明の滅状乾燥ワクチン製剤化に供する。

得られた不活化HAV抗原精製品を用い連続培養に供するには、中性付近の適当な濃度のバッファ(例えば0.01Nリン酸バッファ)中で、また肝ましくはTween 80を0.302V/V%になるよう添加したバッファ中で、HAVおよび各添加物質の組成が次のようになるよう調整される。

すなわち、HAV抗原は蛋白質濃度として0.05V/V%以下、好ましくは0.002V/V%以下含有される。添加される安定化剤としては、アミノ酸および糖類



シウムと20~40 $\mu$ g/mlのDNase I(宝酒造社製)を加えて37℃で3時間処理する。その後、50 $\mu$ g/mlになるようProtelase K(メルク社製)を加えてさらに37℃、1時間処理する。2.5Mリン酸バッファーpH 7.5、エトキシエタノールとブトキシエタノールの1:1混液をそれぞれ1容及び0.8容加えて軽く混和し、2000rpm 10分間遠心し中間層をとり、2mM EDTA、0.002% Tween 80(和光純薬社製)添加0.01Mリン酸バッファー(pH7.4)で200~300 $\mu$ g/mlの抗原濃度になる様に薄液する。この可溶薄液処理液を1~2回繰り返す。この薄液をセファクリル S400HR(ファルマシア社製)によるゲルろ過により最終精製抗原液を得る。最終精製抗原液は50~100 $\mu$ g/mlの濃度であり、TCA(トリクロロ酢酸)ローリー法にて測定した全蛋白質量に対するHAY抗原蛋白質の割合は70~100%を示す。

#### 実施例3 不活化

精製ウイルス液を0.002V/Vs Tween 30及び0.14M塩化ナトリウム添加0.01Mリン酸バッファー(pH 7.5)にてウイルス濃度が20 $\mu$ g/mlになるように希釈

して希釈ろ過する。0.002V/Vs Tween 80添加0.01Mリン酸バッファー(pH7.5)を用い1:2000希釈したホルマリンと等量混合し37℃に12日間置く。途中8日目と12日目終了後に再度希釈ろ過する。不活化を完了したウイルス液は4℃に保存する。

#### 実施例4 凍結乾燥

実施例3で調製した不活化精製抗原液に、アミノ酸として0.1V/Vsアルギニン塩酸塩と0.1V/Vsグルタミン酸ナトリウムを、糖として5V/Vsラクトースと1V/Vsソルビットを添加してHAY抗原が最終的に1 $\mu$ g/mlの濃度になるように0.002V/Vs Tween 30添加0.01Mリン酸バッファー(pH7.5)にてワクチン液を調製した。このワクチン液0.5mlを2mlバイアルに入れ、-50℃凍結にて6時間凍結した後圧力を0.005Torrに下げ、凍結温度を-15℃から9℃に段階的に上げて50時間1次乾燥し、次いで25℃にて圧力を0.005Torrで30時間2次乾燥して凍結乾燥品を得る。

#### 実施例5

実施例3で調製した不活化精製抗原液を凍結乾燥にて37℃における保存安定性試験を実施した。結果

中のHAY抗原の力価をELISA法により測定し、調製後の抗原力価を1とした時の抗原力価の相対値で示した。結果を第1表に示す。

第1表

希釈液	抗原力価変化			
	3日後	5日後	7日後	11日後
PBS-T	0.91	0.77	0.69	0.60
PBS-T+0.01V/Vsナメロナル	0.76	0.09	0.04	-
PBS-T+2mM EDTA+0.01%ナメロナル	0.37	0.56	0.44	0.27

PBS-T: 0.002V/Vs Tween 30, 0.14M塩化ナトリウム添加0.01Mリン酸バッファー(pH 7.5)

#### 実施例2

実施例3で調製したワクチン液を2mlバイアルに0.5mlずつ分注し、様々な温度で凍結乾燥を行い、37℃における保存安定性試験を実施した。結果を第2表に示す。

第2表

凍結乾燥	抗原力価変化		性状	抗原力価変化			
	凍結乾燥後	凍結乾燥後		1日後	7日後	14日後	
①	1.00	0.16	×	○	0.02	-	-
②	1.00	0.70	○	○	3.37	3.93	3.79
③	1.00	0.72	○	○	0.70	0.56	0.50

① PBS-T

② PBS-T+5%ラクトース+0.5%アルギニン+0.5%グルタミン酸ナトリウム

③ ②+0.5%ビラタン

#### 実施例3

実施例4に記したものと同様の方法によって得られた凍結乾燥品の、保存安定性試験を実施した。凍結乾燥後の抗原力価を1とした時の抗原力価の相対値で示した。結果を第3表に示す。

第3表

保存温度	抗原力価変化					
	1週間後	3週間後	5週間後	9週間後	13週間後	17週間後
25℃	0.99	1.15	0.98	1.16	1.12	NT*
37℃	0.91	0.90	0.54	0.30	0.75	0.64
45℃	0.90	0.63	0.62	0.60	0.54	NT*

\* not tested

1-279843(4)

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

0.01

## 実施例 4

参考例 3 で調製したワクチン原液と参考例 4 で調製した凍結乾燥ワクチンを DDY マウスを用いて免疫性を比較した。HAV 抗原量 200 ng、100 ng、50 ng、25 ng の接種量で各 10 匹ずつの DDY マウス腹腔内に接種した。6 週間後採血し、その血清について、抗 HAV 抗体価を HAV 抗原プレートとパーオキシダーゼラベル抗 HAV ウサギ血清を用いた競合抑制 ELISA 法により測定した。その結果を第 4 表に示す。

各抗原量接種における免疫価の場合の平均抗体価を 1 としたときの凍結乾燥ワクチン接種の場合の平均抗体価の相対値の平均で示した。

第 4 表

	相対力価	範囲(95%)
凍結乾燥ワクチン	1.00	0.57~2.33

代理人 井理士 筒井



第 1 頁の続き

⑨発明者 佐藤 征他 新潟県新潟市秋葉 3-18-5  
 ⑩発明者 森田 迪夫 千葉県千葉市千城台東 1-10-4  
 ⑪発明者 水野 高介 熊本県熊本市龍田町上立田 1725-1

抗原力価変化	1日後	7日後	14日後
0.02	-	-	-
0.17	0.33	0.79	-
0.70	0.56	0.50	-

グルタミン酸ナトリウム

方法によって得  
 製法を要した。  
 の抗原力価の相  
 対値。

変化	13週間後	17週間後
16	1.12	NT*
80	0.75	0.64
90	0.54	NT*